

Process for the purification of activated protein C

Patent Number: DE3823519
Publication date: 1990-01-18
Inventor(s): MEYER THOMAS DR (DE)
Applicant(s): BASF AG (DE)
Requested Patent: ☐ DE3823519
Application Number: DE19883823519 19880712
Priority Number(s): DE19883823519 19880712
IPC Classification: C07K3/20; C07K15/06; C12N11/00
EC Classification: C12N9/64F2C21M69
Equivalents:

Abstract

A process for the purification of activated protein C and analogous proteins by affinity chromatography is described.

Data supplied from the **esp@cenet** database - I2

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

①2 Offenlegungsschrift
①1 DE 3823519 A1

⑤1 Int. Cl. 5:
C 07 K 3/20
C 07 K 15/08
C 12 N 11/00

②1 Aktenzeichen: P 38 2 96
②2 Anmeldetag: 12. 7.
②3 Offenlegungstag: 18. 1. 90

THE BRITISH LIBRARY

29 JAN 1990
SCIENCE REFERENCE AND
INFORMATION SERVICE

DE 3823519 A1

⑦1 Anmelder:
BASF AG, 6700 Ludwigshafen, DE

⑦2 Erfinder:
Meyer, Thomas, Dr., 6700 Ludwigshafen, DE

⑤4 Verfahren zur Reinigung von aktiviertem Protein C

Es wird ein Verfahren zur Reinigung von aktiviertem Protein C und analogen Proteinen durch Affinitätschromatographie beschrieben.

DE 3823519 A1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Reinigung von aktiviertem Protein C und analogen Proteinen.

Protein C ist ein Vitamin K-abhängiges Protein, welches als Proenzym einer Serinprotease vorkommt. Das Protein wurde bislang vorwiegend mit Hilfe chromatographischer Methoden, wie Ionenaustauschchromatographie, Gelfiltration, Chromatographie an Heparinsepharose, gereinigt (J. Biol. Chem. 258, 1919 (1983), J. Clin. Invest. 64, 761 (1979), J. Med. 16, 285 (1985)).

Zur Vereinfachung und Effizienzsteigerung dieser Verfahren wurde in jüngster Zeit nach leistungsfähigen affinitätschromatographischen Reinigungsschritten gesucht und Aufarbeitungsschemata mit Hilfe immobilisierter monoklonaler Antikörper gegen Protein C erarbeitet (vgl. Biotechnology 5, 1189 (1987)). Die Reinigung von Proteinen mit Hilfe monoklonaler Antikörper ist zwar sehr effektiv, stellt aber aufgrund der aufwendigen Erzeugung von Antikörpern und wegen der oft unbefriedigenden Standzeiten von Antikörpersäulen einen wichtigen Kostenfaktor dar.

Zur Reinigung von tPA wurde eine affinitätschromatographische Methode entwickelt, bei der Erythrina-Trypsin-Inhibitor (= ETI) verwendet wird (J. Biol. Chem. 259, 11635 (1984), EP-OS 1 12 122). Versuche, weitere Enzyme wie Urokinase und Thrombin auf diese Weise zu reinigen, waren erfolglos.

Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß aktiviertes Protein C und analoge Proteine an immobilisiertem ETI gereinigt werden können.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Reinigung von rohem aktiviertem Protein C oder analogen Proteinen, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man das rohe aktivierte Protein C oder analoge Proteine einer Affinitätschromatographie an immobilisiertem Erythrina-Trypsin-Inhibitor unterwirft.

Unter Protein C analogen Verbindungen sind solche zu verstehen, die sich vom Protein C durch Unterschiede in der Aminosäuresequenz bzw. durch Deletionen, Substitutionen, Insertionen, Inversionen oder Additionen von Aminosäuren vom Protein C unterscheiden, aber Protein C-Wirkung besitzen.

"Rohes Protein C" soll Protein C bedeuten, wie es bei der Aufarbeitung von Protein C-produzierenden Zellen mittels konventioneller chromatographischer Methoden anfällt. Ein solches Protein besitzt normalerweise eine Reinheit von 85–95%.

Der Erythrina-Trypsin-Inhibitor und seine Reinigung sind bekannt (Int. J. Biochem. 19, 601 (1987) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 362, 531 (1981)).

Der Inhibitor kann mit allen üblichen Affinitäts-trägermaterialien gekoppelt werden, wie NCB-aktivierter Sepharose, Glutaraldehyd-aktiviertem Tris-Acryl und epoxid-aktivierten Trägermaterialien.

Das neue Verfahren hat den Vorteil, daß es sehr einfach durchzuführen ist und das Protein C von sehr guter Reinheit liefert.

Hierzu wird der Inhibitor an das Affinitäts-trägermaterial gekoppelt, so daß ein Affinitäts-Gel entsteht. Dieses wird in eine Säule gegeben und mit einem nicht-denaturierenden Puffer äquilibriert. Der pH-Wert des Puffers sollte zwischen 5 und 9 liegen und die Salzkonzentration im Puffer sollte unter 1 Mol/l sein. Nach Auftragen des rohen Proteins wird im schwach sauren Bereich (pH 1,5–3,5) mit einem Puffer eluiert.

Erythrina-Trypsin-Inhibitor wurde nach Vorschrift des Gelherstellers (Pharmacia) an CNBr-aktivierte Sepharose gekoppelt. Das Gel (5 ml) wurde in eine Säule (Durchmesser 1 cm) überführt und mit 20 mM Tris-Acetat, 0,2 M NaCl, 0,01% Tween 80 pH 7,0 äquilibriert. 5 g rohes aktiviertes Protein C wurde mit Äquilibriumspuffer auf die Säule aufgetragen. Das Gel wurde mit Äquilibriumspuffer gewaschen bis die UV-Absorption des Durchlaufs konstant blieb und anschließend mit 0,1 M Glycin/HCl, 0,05 M NaCl, 0,05 M Arginin, 0,01% Tween 80 pH 2,5 das Protein C eluiert. Das Protein enthält gemäß SDS-Gelelektrophorese keine Verunreinigungen mehr.

Dasselbe Ergebnis erhält man, wenn man die Elution mit 1,75 M KSCN, 2 M Harnstoff oder 1,5 M Guanidiniumhydrochlorid durchführt.

Patentanspruch

Verfahren zur Reinigung von rohem aktiviertem Protein C oder analogen Proteinen, dadurch gekennzeichnet, daß man das rohe aktivierte Protein C oder analoge Proteine einer Affinitätschromatographie an immobilisiertem Erythrina-Trypsin-Inhibitor unterwirft.